








New polyamino acids having grafted alpha-tocopherol moieties, useful as biodegradable, biocompatible carriers for active agents, e.g. drugs, nutrients, cosmetic agents or plant protectants**Publication number:** FR2840614 (A1)**Publication date:** 2003-12-12**Inventor(s):** CHAN YOU PING; ANGOT STEPHANIE; BREYNE OLIVIER**Applicant(s):** FLAMEL TECH SA [FR]**Classification:**

- International: A61K47/42; A61K8/67; A61K8/72; A61K8/88; A61K9/51; A61K38/22; A61K47/34; A61Q19/00; C08G69/10; C08G69/40; C08G69/48; C08L77/04; C08L89/00; A61K47/42; A61K8/30; A61K8/72; A61K9/51; A61K38/22; A61K47/34; A61Q19/00; C08G69/00; C08L77/00; C08L89/00; (IPC1-7): C08G69/48; A61K9/51; A61K31/785; A61K47/42

- European: A61K8/88; A61K8/67L; A61K9/51; A61K47/34; A61Q19/00; C08G69/10; C08G69/48

Application number: FR20020007008 20020607**Priority number(s):** FR20020007008 20020607**Also published as:** FR2840614 (B1) ZA200409892 (A) US2006099264 (A1) MXPA04012300 (A) JP2005531652 (T)

more >>

Cited documents: EP0179023 (A2) WO8703891 (A1) US6320017 (B1)**Abstract of FR 2840614 (A1)**

Polyamino acids (I) comprising aspartic and/or glutamic units, where at least some of the units carry grafts containing at least one alpha-tocopherol moiety, are new.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :

2 840 614

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

02 07008

⑤① Int Cl⁷ : C 08 G 69/48, A 61 K 47/42, 31/785, 9/51

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 07.06.02.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 12.12.03 Bulletin 03/50.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : FLAMEL TECHNOLOGIES Société
anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : CHAN YOU PING, ANGOT STEPHA-
NIE et BREYNE OLIVIER.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET PLASSERAUD.

⑤④ POLYAMINOACIDES FONCTIONNALISÉS PAR DE L'ALPHA-TOCOPHEROL ET LEURS APPLICATIONS
NOTAMMENT THERAPEUTIQUES.

⑤⑦ La présente invention concerne des nouveaux maté-
riaux à base de polyaminoacides biodégradables, utiles no-
tamment pour la vectorisation de principe (s) actif (s) (PA).
L'invention vise aussi de nouvelles compositions pharma-
ceutiques, cosmétiques, diététiques ou phytosanitaires à
base de ces polyaminoacides.

Le but de l'invention est de fournir une nouvelle matière
première polymère, susceptible d'être utilisée pour la vecto-
risation de PA et permettant de satisfaire de manière opti-
male à toutes les spécifications du cahier des charges:
biocompatibilité, biodégradabilité, aptitude à se transformer
aisément et économiquement en particules de vectorisation
de principes actifs, ces particules étant elles même propres
à former des suspensions colloïdales aqueuses stables, à
s'associer facilement avec de nombreux principes actifs, et
à libérer ces principes actifs in vivo.

Ce but est atteint par la présente invention qui concerne
tout d'abord des polyaminoacides amphiphiles comprenant
des unités aspartique et/ou des unités glutamiques, carac-
térisés en ce qu'au moins une partie de ces unités sont por-
teuses de greffons comportant au moins un motif alpha-
tocophérol, e. g.: (polyglutamate ou polyaspartate greffé par
l'alpha tocophérol d'origine synthétique ou naturelle).

FR 2 840 614 - A1



POLYAMINOACIDES FONCTIONNALISES PAR DE L'ALPHA-TOCOPHEROL ET LEURS APPLICATIONS NOTAMMENT THERAPEUTIQUES

La présente invention concerne des nouveaux matériaux à base de
5 polyaminoacides biodégradables, utiles notamment pour la vectorisation de principe(s)
actif(s) (PA).

L'invention vise aussi de nouvelles compositions pharmaceutiques, cosmétiques,
diététiques ou phytosanitaires à base de ces polyaminoacides. Ces compositions peuvent
être du type de celles permettant la vectorisation de PA et se présentant de préférence sous
10 forme d'émulsions, de micelles, de particules, de gels, d'implants ou de films.

Les PA considérés sont, avantageusement, des composés biologiquement actifs et
qui peuvent être administrés à un organisme animal ou humain par voie orale, parentérale,
nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intra-musculaire, intradermique,
intrapéritonéale, intracérébrale, buccale, etc.
15 Les PA plus particulièrement mais non limitativement concernés par l'invention sont des
protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides,
des oligo ou des polynucléotides, et des molécules organiques. Mais il peut aussi s'agir de
produits cosmétiques ou de produits phytosanitaires, tels que des herbicides, des
insecticides, des fongicides, etc.

20 Dans le domaine de la vectorisation des principes actifs notamment
médicamenteux, il existe un besoin, dans beaucoup de cas, :

- de les protéger contre la dégradation (hydrolyse, précipitation sur site,
digestion enzymatique etc..) jusqu'à ce qu'ils atteignent leur site d'action,
- 25 • et/ou de contrôler leur vitesse de libération afin de maintenir un niveau
constant sur une durée définie, soit
- et/ou de véhiculer (en les protégeant) au site d'action.

A ces fins, plusieurs types de polymères ont été étudiés et certains sont même
30 disponibles commercialement. On peut citer par exemple les polymères du type
polylactique, polylactique-glycolique, polyoxyéthylène-oxypropylène, polyaminoacide ou
encore polysaccharide. Ces polymères constituent des matières premières permettant de
fabriquer, par exemple, des implants massiques, des microparticules, des nanoparticules,
des vésicules, des micelles ou des gels. Outre le fait que ces polymères doivent être
35 adaptés à la fabrication de tels systèmes, ils doivent également être biocompatibles, non-
toxiques, non-immunogènes, économiques et ils doivent pouvoir être facilement éliminés
du corps et/ou biodégradables. Sur ce dernier aspect, il est de surcroît essentiel que la
biodégradation dans l'organisme génère des produits non-toxiques.

A titre d'illustration de l'art antérieur concernant des polymères employés comme matières premières pour la réalisation de systèmes de vectorisation de PA, divers brevets ou demandes de brevet ou articles scientifiques sont évoqués ci-après.

5 Le brevet US 4,652,441 décrit des microcapsules de polylactide encapsulant l'hormone LH-RH . Ces microcapsules sont produites en préparant une émulsion eau-dans-huile-dans-eau et comprennent une couche interne aqueuse contenant l'hormone, une substance (gélatine) fixant cette dernière, une couche huileuse de polylactide, ainsi qu'une
10 couche externe aqueuse (Alcool polyvinylique). La libération du PA peut se faire sur une période de plus de 2 semaines après injection sous-cutanée.

Le brevet US 6,153,193 décrit des compositions à base de micelles de poly(oxyéthylène)-poly(oxypropylène) amphiphiles, pour la vectorisation d'anti-cancéreux tel que l'adriamycine.

15 Akiyoshi et al. (J. Controlled Release 1998, 54, 313-320) décrivent des pullulans qui sont rendus hydrophobes par greffage de cholestérol et qui forment des nanoparticules dans l'eau. Ces nanoparticules aptes à se complexer de manière réversible avec l'insuline, forment des suspensions colloïdales stables.

20 Le brevet US 4,351,337 décrit des copolyaminoacides amphiphiles, à base de leucine et de glutamate, utilisables sous forme d'implants ou de microparticules pour la libération contrôlée de principes actifs. La libération de ces derniers peut se faire sur une durée très longue dépendant de la vitesse de dégradation du polymère.

25 Le brevet US 4,888,398 décrit des polymères à base de polyglutamate ou polyaspartate, et éventuellement polyleucine, avec des groupements pendants de type alkyloxycarbonylméthyle, placés de façon aléatoire sur la chaîne polyaminoacide. Ces polyaminoacides, greffés par des groupements latéraux e.g. méthoxycarbonylméthyle, sont
30 utilisables sous forme d'implants biodégradables contenant un PA à libération prolongée.

Le brevet US 5,904,936 décrit des nanoparticules obtenues à partir d'un polymère bloc polyleucine-polyglutamate, aptes à former des suspensions colloïdales stables et capables de s'associer spontanément avec des protéines biologiquement actives sans les
35 dénaturer. Ces dernières peuvent ensuite être libérées in vivo de manière contrôlée, sur une longue période.

La demande de brevet WO 00/30618 décrit des nanoparticules obtenues à partir d'un polymère bloc poly(glutamate de sodium)(polyglutamate de méthyle, éthyle, hexadécyle ou dodécyle), aptes à former des suspensions colloïdales stables et capables de s'associer spontanément avec des protéines biologiquement actives sans les dénaturer. Ces dernières peuvent ensuite être libérées in vivo de manière contrôlée, sur une longue période.

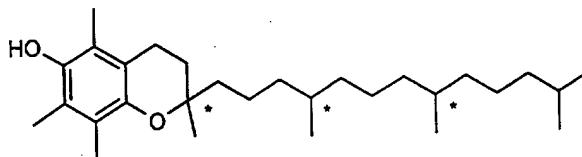
Ces copolyaminoacides amphiphiles sont modifiés par la présence d'une chaîne latérale alkyle hydrophobe.

Le brevet US 5,449,513 décrit des copolymères bloc amphiphiles comprenant un bloc polyoxyéthylène et un bloc polyaminoacide, par exemple poly(bêta-benzyl-L-aspartate). Ces polymères polyoxyéthylène-polybenzylaspartate forment des micelles qui sont aptes à encapsuler des molécules actives hydrophobes telles que l'adryamicine ou l'indométhacine.

La demande de brevet WO 99/61512 décrit des polylysines et des polyornithines fonctionnalisées par un groupe hydrophobe (acide palmitique relié à la polylysine ou ornithine par un espaceur formé par un motif succinique) et un groupe hydrophile (polyoxyéthylène). Ces polymères, par exemple la polylysine greffée avec des chaînes polyoxyéthylène et palmitoyl forment en présence de cholestérol des vésicules capables d'encapsuler la doxorubicine ou l'ADN.

Il est par ailleurs connu de recourir à des dérivés de vitamine E, et plus précisément d'alpha-tocophérol, pour construire des systèmes de vectorisation de PA.

La vitamine E naturelle est constituée d'un mélange de composés dénommés tocophérols (voir Burton et Ingold, Acc. Chem. Res. 1986, 19, 194-201) et dans ce mélange, le dérivé alpha-tocophérol est largement majoritaire. La vitamine E et certains de ses dérivés sont aujourd'hui utilisés comme source de vitamine ou comme antioxydant dans des aliments et produits cosmétiques. Pour ces utilisations courantes, on trouve la vitamine E sous sa forme D-alpha-tocophérol (sa forme naturelle) ou sous sa forme D,L-alpha-Tocophérol (forme racémique et synthétique). Ces deux produits sont considérés comme essentiellement non toxiques à des doses bien au-delà des doses thérapeutiques. La structure de l'alpha-tocophérol est la suivante.



Les positions chirales sont marquées d'un astérisque. La forme naturelle possède les configurations R, R, R et la forme synthétique est un mélange où les carbones chiraux sont indépendamment R ou S.

5

S'agissant des dérivés de la vitamine E utilisés dans le domaine de la vectorisation de principes actifs, il n'existe, à ce jour et à la connaissance des inventeurs, aucun produit polymère à base d'alpha-tocophérol, à l'exception de polymères de type polyoxyéthylène dont une extrémité est greffée par des groupements alpha-tocophérol-succinate. Est
10 d'ailleurs disponible sur le marché, du PolyEthylèneGlycol greffé alpha-tocophérol-succinate en bout de chaîne (vitamine E PEGylée), commercialisé sous la dénomination TPGS 1000, par la société Eastman Chemical, Ltd. Ce produit breveté en 1954 (US 2,680,749) est aujourd'hui utilisé comme source de vitamine E par voie orale. Ce polymère, de même que l'alpha-tocophérol-succinate et l'alpha-tocophérol non modifié,
15 ont été proposés pour la vectorisation de principes actifs.

Le brevet US 5,869,703 décrit des composés voisins dans lesquels la chaîne polyoxyéthylène comporte à une extrémité de l'alpha-tocophérol et à son autre extrémité un résidu (méth)acrylique. Ces dérivés d'alpha-tocophérol sont utilisés pour préparer des
20 vésicules amphiphiles (liposomes) stables, directement employées dans des applications cosmétiques.

La demande de brevet WO 00/71163 décrit des formulations à base de PolyEthylèneGlycol greffé alpha-tocophérol-succinate en bout de chaîne (TPGS 1000) et
25 d'alpha-tocophérol pour la solubilisation de paclitaxel (produit anticancéreux). A ce jour, la toxicité liée à la partie polyoxyéthylène n'est pas connue et on sait que le polyoxyéthylène n'est pas dégradé in vivo. De plus, ce composé ne contient qu'un seul motif d'alpha-tocophérol par chaîne de polymère et il a des propriétés en solution assimilables à celles des tensioactifs. En tout état de cause, l'utilisation de ce produit pour
30 la vectorisation conduirait à des associations polymère – principe actif peu stables.

Le brevet EP 0 243 446 décrit l'utilisation d'(hémi)succinate d'alpha-tocophérol (dérivé d'acide organique d'alpha-tocophérol) pour la fabrication de vésicules en combinaison avec un sel d'amine. Ces vésicules peuvent être utilisées pour l'encapsulation
35 de divers principes actifs incluant des petites molécules, des peptides et des protéines. De manière générale, il est indiqué dans ce brevet que l'acide organique peut être un aminoacide ou un polyaminoacide. Toutefois, aucune précision n'est donnée à cet égard. Seuls des (hémi)succinates d'alpha-tocophérol sont exemplifiés.

Ainsi, même s'il existe de très nombreuses solutions techniques dans l'art antérieur, développées et proposées pour la vectorisation des principes actifs médicamenteux, la réponse à l'ensemble des exigences est difficile obtenir et demeure insatisfaisante.

- 5 Dans ce contexte, l'un des objectifs essentiels de la présente invention est de fournir une nouvelle matière première polymère, susceptible d'être utilisée pour la vectorisation de PA et permettant de satisfaire de manière optimale à toutes les spécifications du cahier des charges :
- o biocompatibilité,
 - 10 o biodégradabilité,
 - o aptitude à se transformer aisément et économiquement en particules de vectorisation de principes actifs,
 - o ces particules étant elles-mêmes propres:
 - à former des suspensions colloïdales aqueuses stables,
 - 15 ▪ à s'associer facilement avec de nombreux principes actifs,
 - et à libérer ces principes actifs in vivo.

Cet objectif, parmi d'autres, est atteint par la présente invention qui concerne tout d'abord des polyaminoacides amphiphiles comprenant des unités aspartiques et/ou des
20 unités glutamiques, caractérisés en ce qu'au moins une partie de ces unités sont porteuses de greffons comportant au moins un motif alpha-tocophérol.

Ces nouveaux polymères ont un squelette biodégradable à base de polyaminoacides porteurs de chaînes latérales comprenant de l'alpha-tocophérol. Ces
25 polymères présentent des propriétés d'association et/ou d'encapsulation surprenantes en comparaison avec des produits analogues et de plus, ils sont facilement dégradés en présence d'enzymes.

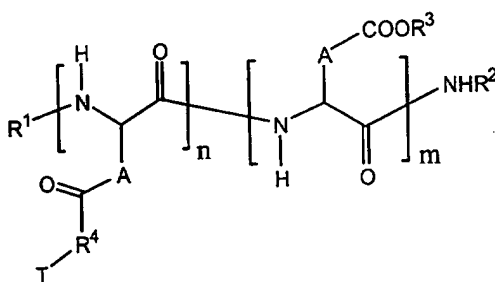
Il est du mérite de la demanderesse d'avoir eu l'idée de combiner, de façon tout à fait judicieuse et avantageuse, des polyaminoacides particuliers polyAsp et/ou polyGlu,
30 biodégradables avec des greffons à base d'alpha-tocophérol (vitamine E) pour la vectorisation de PA.

Au sens de l'invention le terme "*polyaminoacide*" couvre aussi bien les
35 oligoaminoacides comprenant de 2 à 20 unités aminoacide que les polyaminoacides comprenant plus de 20 unités aminoacide.

De préférence, les polyaminoacides selon la présente invention sont des oligomères ou des homopolymères comprenant des unités récurrentes aminoacide glutamique ou aspartique ou des copolymères comprenant un mélange de ces deux types d'unités aminoacide, lesdites unités étant partiellement substituées par des greffons comportant de l'alpha-tocophérol. Les unités considérées dans ces polymères sont des acides aminés ayant la configuration D, L ou D, L et sont liées par leurs positions alpha ou gamma pour l'unité glutamate ou glutamique et alpha ou bêta pour l'unité aspartique ou aspartate.

Les unités aminoacide préférées sont celles ayant la configuration L et une liaison de type alpha.

De manière plus préférée encore, les polyaminoacides selon l'invention répondent à la formule générale (I) suivante :



(I)

dans laquelle :

- R¹ représente un H, un alkyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10, benzyle, une unité acide aminé terminale ;
- R² représente un H, un groupe acyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10, ou un pyroglutamate ;
- R³ est un H ou une entité cationique, de préférence sélectionnée dans le groupe comprenant :
 - les cations métalliques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant : le sodium, le potassium le calcium, le magnésium,
 - les cations organiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant :
 - les cations à base d'amine,
 - les cations à base d'oligoamine,
 - les cations à base de polyamine (la polyéthylèneimine étant particulièrement préférée),

- les cations à base d'acide(s) aminé(s) avantageusement choisis dans la classe comprenant les cations à base de lysine ou d'arginine,
- ou les polyaminoacides cationiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant la polylysine ou l'oligolysine ;
- R^4 représente une liaison directe ou un "espaceur" à base de 1 à 4 unités acide aminé ;
- A représente indépendamment un radical $-CH_2-$ (unité aspartique) ou $-CH_2-CH_2-$ (unité glutamique) ;
- $n/(n+m)$ est défini comme le taux de greffage molaire et varie de 0,5 à 100 % molaire ;
- $n + m$ varie de 3 à 1000, de préférence entre 30 et 300 ;
- T représente un motif alpha-tocophérol.

Pour ces utilisations courantes, on trouve la vitamine E sous sa forme D-alpha-tocophérol (sa forme naturelle) ou sous sa forme D,L-alpha-Tocophérol (forme racémique et synthétique). Ces deux produits sont considérés comme essentiellement non toxiques à des doses bien au-delà des doses thérapeutiques. Dans le cadre de l'invention, ces deux formes d'alpha-tocophérol sont préférées.

L'alpha-tocophérol est d'origine naturelle ou synthétique.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, les polyaminoacides sont des homopolymères d'alpha-L-glutamate ou d'alpha-L-glutamique.

Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, les polyaminoacides sont des homopolymères d'alpha-L-aspartate ou d'alpha-L-aspartique.

Selon un troisième mode de réalisation de l'invention, les polyaminoacides sont des copolymères d'alpha-L-aspartate/alpha-L-glutamate ou d'alpha-L-aspartique/alpha-L-glutamique.

Avantageusement, la distribution des unités aspartiques et/ou glutamiques porteuses de greffons comportant au moins un motif alpha-tocophérol est telle que les polymères ainsi constitués sont soit aléatoires, soit de type bloc, soit de type multibloc.

Selon un autre mode de définition, les polyaminoacides selon l'invention ont une masse molaire qui se situe entre 2 000 et 100 000 g/mole, et de préférence entre 5 000 et 40 000 g/mole.

5 Il est par ailleurs préférable que le taux de greffage molaire en alpha-tocophérol des polyaminoacides selon l'invention, soit compris entre 3 et 70 %, et de préférence entre 5 et 50 %.

De manière remarquable, les polyaminoacides de l'invention sont susceptibles d'être utilisés de plusieurs façons selon le taux de greffage. Les méthodes de mise en
10 forme d'un polymère pour l'encapsulation d'un principe actif sous les diverses formes visées par l'invention sont connues de l'homme de l'art. Pour plus de détails, on peut se référer, par exemple à ces quelques références particulièrement pertinentes :

- "Microspheres, Microcapsules and Liposomes ; vol 1. Preparation and chemical applications" Ed. R. Arshady, Citus Books 1999. ISBN : 0-9532187-1-6.
- 15 "Sustained-Release Injectable Products" Ed. J. Senior et M. Radomsky, Interpharm Press 2000. ISBN : 1-57491-101-5.
- "Colloidal Drug Delivery Systems" Ed. J. Kreuter, Marcel Dekker, Inc. 1994. ISBN : 0-8247-9214-9.
- 20 "Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology" Ed. D.L. Wise, Marcel Dekker, Inc. 2000. ISBN : 0-8247-0369-3.

Les polyaminoacides sont en outre extrêmement intéressants, du fait qu'à un taux de greffage relativement faible de l'ordre de 3 à 10 %, ils forment dans l'eau à pH 7,4 (par exemple avec un tampon phosphate) des suspensions colloïdales ou gels en fonction de la
25 concentration de polymères. De plus, les particules de polyaminoacides formant la phase dispersée de la suspension colloïdale, peuvent s'associer aisément avec des principes actifs tels que des protéines, peptides ou petites molécules. La mise en forme préférée est celle décrite dans la demande de brevet WO 00/30618 de la demanderesse et qui consiste à disperser le polymère dans l'eau et d'incuber la solution en présence d'un PA. Cette
30 solution peut ensuite être filtrée sous 0,2 µm puis directement injectée à un patient.

Au-delà de 10 % de taux de greffage, le polymère peut former des microparticules capables d'associer ou d'encapsuler des PA. Dans ce contexte, la mise en forme des microparticules peut se faire en co-solubilisant le PA et le polymère dans un solvant
35 organique approprié puis le mélange précipité dans l'eau. Les particules sont ensuite récupérées par filtration et peuvent ensuite être utilisées pour une administration par voie orale (sous forme de gélule, sous forme compactée et/ou enrobée ou bien encore sous forme dispersée dans une huile) ou par voie parentérale après redispersion dans l'eau.

A des taux supérieurs à 30 % de greffage, la redispersion du polymère en phase aqueuse devient plus difficile du fait de la quantité plus faible des fonctions carboxylate ionisables et le polymère précipite. Dans ce cas, le polymère peut être solubilisé dans un solvant biocompatible tel que la N-méthylpyrrolidone ou une huile appropriée telle que le
5 Migliol® puis injecté en intramusculaire ou sous-cutanée ou dans une tumeur. La diffusion du solvant ou de l'huile conduit à la précipitation du polymère sur le site d'injection et forme ainsi un dépôt. Ces dépôts assurent ensuite une libération contrôlée par diffusion et/ou par érosion et/ou par dégradation hydrolytique ou enzymatique du polymère.

10

De façon générale, les polymères de l'invention, sous forme neutre ou ionisée, sont utilisables seuls ou dans une composition liquide, solide ou gel et dans un milieu aqueux ou organique.

15

Il convient de comprendre que le polymère à base de polyaminoacides contient des fonctions carboxyliques qui sont soit neutres (forme COOH), soit ionisées selon le pH et la composition. Pour cette raison, la solubilité dans une phase aqueuse est directement fonction du taux de COOH libre (non greffé par la vitamine E) et du pH. En solution aqueuse, le contre-cation peut être un cation métallique tel que le sodium, le calcium ou le
20 magnésium, ou un cation organique tel que la triéthanolamine, la tris(hydroxyméthyl)-aminométhane ou une polyamine tel que la polyéthylèneimine.

Les polymères de l'invention sont obtenus par des méthodes connues de l'homme de l'art. Les polyaminoacides peuvent être obtenus au moins de deux façons :

25

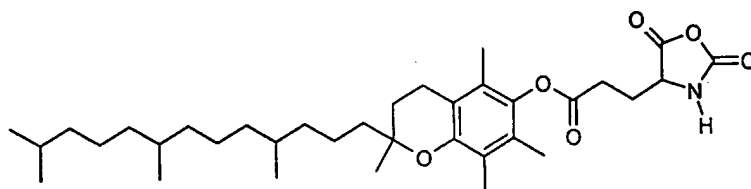
- greffage de l'alpha-tocophérol sur un polyaminoacide, ou
- polymérisation des dérivés NCA d'alpha-tocophérol suivie d'une hydrolyse sélective.

Dans le premier cas, on prépare par exemple un polyaminoacide,
30 homopolyglutamate, homopolyaspartate ou un copolymère glutamate/aspartate, bloc, multibloc ou aléatoire selon des méthodes classiques.

Pour l'obtention de polyaminoacide de type alpha, la technique la plus courante est basée sur la polymérisation d'anhydrides de N-carboxy-aminoacides (NCA), décrites, par
35 exemple, dans l'article "*Biopolymers*, 1976, 15, 1869 et dans l'ouvrage de H.R. Kricheldorf "*alpha-Aminoacid-N-carboxy Anhydride and related Heterocycles*" Springer Verlag (1987). Les dérivés d'NCA sont de préférence des dérivés NCA-O-Me, NCA-O-Et ou NCA-O-Bz (Me = méthyl, Et = Ethyle et Bz = Benzyle). Les polymères sont ensuite

- hydrolysés dans des conditions appropriées pour obtenir le polymère sous sa forme acide. Ces méthodes sont inspirées de la description donnée dans le brevet FR 2 801 226 de la demanderesse. Un certain nombre de polymères utilisables selon l'invention, par exemple, de type poly(alpha-L-aspartique), poly(alpha-L-glutamique), poly(alpha-D-glutamique) et
- 5 poly(gamma-L-glutamique) de masses variables sont disponibles commercialement. Le polyaspartique de type alpha-beta est obtenu par condensation de l'acide aspartique (pour obtenir un polysuccinimide) suivie d'une hydrolyse basique (voir Tomida et al. Polymer 1997, 38, 4733-36).
- 10 Le couplage de l'alpha-tocophérol avec une fonction acide est réalisé aisément par réaction du polyaminoacide avec la vitamine E en présence d'un carbodiimide comme agent de couplage et de préférence, un catalyseur tel que le 4-diméthylaminopyridine et dans un solvant approprié tel que la diméthylformamide (DMF), la N-méthyl pyrrolidone (NMP) ou la diméthylsulfoxyde (DMSO). Le carbodiimide est par exemple, le
- 15 dicyclohexylcarbodiimide ou le diisopropylcarbodiimide. Le taux de greffage est contrôlé chimiquement par la stœchiométrie des constituants et réactifs ou le temps de réaction.

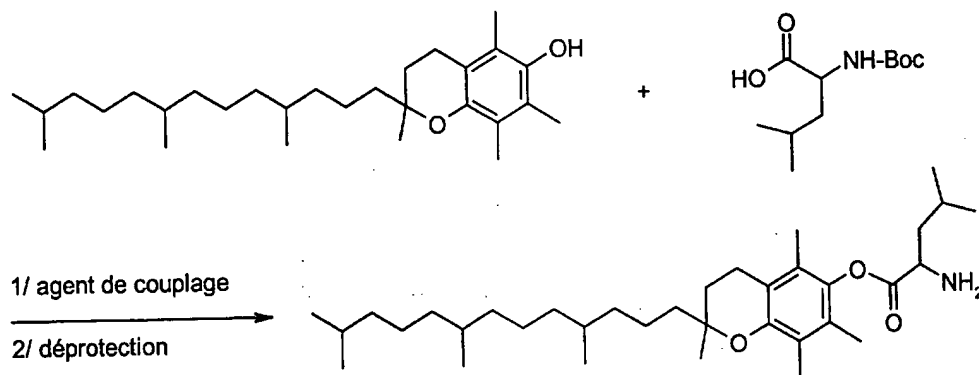
- Dans le deuxième cas, on synthétise un dérivé NCA de l'alpha-tocophérol de structure suivante. La synthèse est analogue à celle décrite pour le N-carboxyanhydride de
- 20 stéaryl-glutamate par Poché et al. *Macromolecules* 1995, 28, 6745-53.



- Le dérivé NCA de l'alpha-tocophérol-glutamate est ensuite copolymérisé avec par
- 25 exemple avec le NCA de benzyl-glutamate et pour obtenir les fonctions glutamate ou glutamique, on réalise une réaction d'hydrolyse sélective des fonctions benzyles dans un mélange d'acide trifluoroacétique et d'acide bromohydrique à température ambiante. Il convient de noter que cette deuxième voie de synthèse permet de réaliser aisément des copolymères aléatoires, blocs ou multiblocs simplement en modifiant l'ordre d'ajout des
- 30 monomères.

Le couplage de la vitamine E via un espaceur constitué de 1 à 4 acides aminés peut être réalisé par réactions successives de la vitamine E avec des acides aminés, protégés de façon appropriée, puis déprotégés pour avoir une fonction amine greffable sur le polymère

ou par réaction avec un oligopeptide. Par exemple, la synthèse d'un alpha-tocophérol avec un motif leucine est réalisée selon une méthode générale bien connue de l'homme de l'art et selon le schéma suivant.



5

Il convient de noter que le greffage direct de l'alpha-tocophérol sur le polymère se fait via une fonction ester alors que dans le cas de la présence d'un espaceur à base d'acide(s) aminé(s), elle se fait via une fonction amide. Comme pour la réalisation d'une liaison ester, la liaison amide peut se faire de la même manière en utilisant un agent de couplage classique tel qu'un dialkyl-carbodiimide.

10

Selon un autre de ses aspects, l'invention vise une composition pharmaceutique, cosmétique, diététique ou phytosanitaire comprenant au moins l'un des polyaminoacides tels que définis ci-dessus.

15

Selon une déclinaison avantageuse de l'invention, cette composition comprend, outre l'alpha-tocophérol, au moins un principe actif, qui peut être thérapeutique, cosmétique, diététique ou phytosanitaire.

20

De préférence, le principe actif est une protéine, une glycoprotéine, un polysaccharide, un liposaccharide, un oligonucléotide, un polynucléotide ou un peptide.

Plus préférentiellement encore, le principe actif est une petite molécule organique hydrophobe, hydrophile ou amphiphile.

25

Cette composition peut être sous forme de nanoparticules, de microparticules, d'émulsions, de gels, de micelles, d'implants, de poudres ou de films.

Suivant l'une de ses formes particulièrement préférées, la composition, chargée ou non en principe actif(s), est une suspension colloïdale stable de nanoparticules et/ou de microparticules et/ou de micelles de polyaminoacides, dans une phase aqueuse.

5 La composition selon l'invention, dès lors qu'elle est pharmaceutique, peut être administrée par voie orale, parentérale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou buccale.

10 Il est également envisageable que la composition soit sous forme de solution dans un solvant biocompatible, susceptible d'être injectée en sous-cutané, intramusculaire ou dans une tumeur.

Selon une autre variante, la composition selon l'invention est formulée de telle sorte qu'elle soit apte à former un dépôt sur le site d'injection.

15

L'invention vise aussi des compositions qui comprennent des polyaminoacides selon l'invention et des PA et qui sont susceptibles d'être utilisées pour la préparation :

- de médicaments, en particulier pour administration orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale ou intracérébrale, les principes actifs de ces médicaments pouvant être, notamment, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des liposaccharides, des oligonucléotides, des polynucléotides et des petites molécules organiques hydrophobes, hydrophiles ou amphiphiles,
- 20 • et/ou des nutriments,
- 25 • et/ou de produits cosmétiques ou phytosanitaires.

Cette préparation est caractérisée en ce qu'elle consiste essentiellement à mettre en œuvre au moins l'un des polyaminoacides selon l'invention, tels qu'ils sont définis ci-dessus, et/ou la composition également décrite supra.

30

Comme indiqué ci-dessus, les techniques d'association d'un ou de plusieurs PA aux polyaminoacides greffés alpha-tocophérol selon l'invention, sont décrites notamment dans la demande de brevet WO 00/30618.

35

L'invention concerne également une méthode de traitement thérapeutique consistant essentiellement à administrer la composition telle que décrite dans le présent

exposé, par voie orale, parentérale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou buccale.

L'invention concerne en outre une méthode de traitement thérapeutique consistant
 5 essentiellement à une composition telle que décrite supra sous forme de solution dans un solvant biocompatible puis de l'injecter en sous-cutané, intramusculaire ou dans une tumeur, de préférence de manière à ce qu'elle forme un dépôt sur le site d'injection.

Comme exemples de PA susceptibles d'être associés aux polyaminoacides selon
 10 l'invention, qu'ils soient ou non sous forme de (nano ou micro)particules, on peut citer :

- les protéines telles que l'insuline, les interférons, les hormones de croissance, les interleukines, l'érythropoïétine ou les cytokines ;
- les peptides telles que la leuprolide ou la cyclosporine ;
- les petites molécules telles que celles appartenant à la famille des
 15 anthracyclines, des taxoïdes ou des camptothécines ;
- et leurs mélanges.

L'invention sera mieux comprise et ses avantages et variantes de mise en œuvre
 ressortiront bien des exemples qui suivent et qui décrivent la synthèse des
 20 polyaminoacides greffés alpha-tocophérol, leur transformation en système de vectorisation de PA (suspension aqueuse stable de nanoparticules) et la démonstration de la capacité d'un tel système de s'associer à des PA (petites molécules organiques, protéines...) pour former des compositions pharmaceutiques.

25 Exemple 1 : Polymère P1

Synthèse d'un polyglutamate greffé par l'alpha-tocophérol d'origine synthétique

On solubilise 5,5 g d'un alpha-L-polyglutamate (de masse équivalente à environ 10 000
 par rapport à un standard en polyoxyéthylène et obtenue par polymérisation de
 NCAGluOMe suivi d'une hydrolyse comme décrits dans la demande de brevet FR
 30 2 801 226) dans 92 mL de diméthylformamide (DMF) en chauffant à 40°C pendant
 2 heures. Une fois le polymère solubilisé, on laisse revenir la température à 25°C et on
 ajoute successivement 1,49 g de D,L-alpha-tocophérol (> 98 % obtenu de Fluka®)
 préalablement solubilisé dans 6 ml de DMF, 0,09 g de 4-diméthylaminopyridine
 préalablement solubilisé dans 6 mL de DMF et 0,57 g de diisopropylcarbodiimide
 35 préalablement solubilisé dans 6 mL de DMF. Après 8 heures à 25°C sous agitation, le
 milieu réactionnel est versé dans 800 ml d'eau contenant 15 % de chlorure de sodium et
 d'acide chlorhydrique (pH 2). Le polymère précipité est ensuite récupéré par filtration,
 lavé par de l'acide chlorhydrique 0,1 N puis par de l'eau. Le polymère est ensuite

resolubilisé dans 75 mL de DMF puis reprecipité dans de l'eau contenant comme précédemment du sel et de l'acide à pH 2. Après 2 lavages à l'eau, on lave plusieurs fois par de l'éther diisopropylique. Le polymère est ensuite séché à l'étuve sous vide à 40°C. On obtient un rendement de l'ordre de 85 %.

- 5 Le taux de greffage estimé par RMN du proton est d'environ 7,8 % et une analyse par HPLC révèle un taux résiduel de tocophérol inférieur à 0,3 %.

Mw (mesuré par GPC en éluant avec la NMP) = 17 500 g/mol (en équivalent de polyméthyl méthacrylate)

10 Exemples 2, 3, 4 et 5 : Synthèse de polymères P2, P3, P4 et P5

On réalise de la même façon des polymères ayant des quantités variables de tocophérol

Tableau 1 :

Polymère	Alpha-tocophérol	Taux de greffage
P2	Synthétique : D,L	5,2 %
P3	Synthétique : D,L	12,8 %
P4	Synthétique D,L	20,0 %
P5	Synthétique D,L	50,0 %

Dans tous les cas, la quantité de tocophérol effectivement greffé a été confirmée par RMN.

15

Exemple 6 : Polymère P6

Synthèse d'un polyglutamate greffé par l'alpha-tocophérol d'origine naturelle

De façon analogue, on synthétise le polymère P6 avec 7,3 % de D-alpha-tocophérol d'origine naturelle (à 98,5 % et obtenue de la société ADM France). La masse molaire est de 17 400 (GPC NMP, éq. PMMA).

20

Exemple 7 : Analyse des polymères en solution aqueuse

Les polymères sont mis en solution dans un tampon phosphate saline à pH 7,4 à des concentrations variant de 10 à 40 mg/mL et on ajuste le pH à 7,4 par ajout de soude à

- 25 0,1 N. On observe visuellement la solubilisation.

Tableau 2 : solubilité dans l'eau saline à pH 7,4

Polymère	Taux de greffage	Concentration	Aspect
P1 (D,L)	7,8 %	10 à 30 mg/mL	Soluble et limpide
P3 (D,L)	12 %	10 mg/mL	Précipité très fin
P4 (D,L)	20 %	10 mg/mL	Précipité très fin
P6 (D)	7,3 %	10 à 30 mg/mL	Soluble et limpide

Tampon phosphate : 0,01 M phosphate, 0,0027 M KCl et 0,137M NaCl.

- Une observation en transmission électronique des solutions limpides du polymère P1 déposé sur un support montre l'existence de nanoparticules de 15 à 25 nm. Une analyse comparative des solutions du polymère P1, P6 et l'alpha-tocophérol succinate à 15 mg/mL dans l'eau à pH 7,4 (tampon phosphate) révèle que seul l'alpha-tocophérol succinate développe une solution laiteuse caractéristiques des vésicules comme décrit dans le brevet EP 0 243 446.

Exemple 8 : Adsorption d'un colorant sur le polymère P1

- Selon l'un des objets de l'invention, les polymères peuvent être utilisés sous forme de suspension colloïdale dans l'eau et associés un principe actif. Pour cette application, nous démontrons dans l'expérience ci-après qu'avec certains polymères, notamment ceux avec un taux de greffage de l'ordre de 5 à 10 % de tocophérol, la capacité d'adsorption est supérieure à celle d'un composé analogue de l'art antérieur.

- Pour cette étude, nous avons comparé le polymère P1 avec un polymère analogue ayant une chaîne dodécanol greffé sur un polyglutamate. Ce polymère est décrit dans le brevet WO 00 30618.

- L'étude est réalisée de la façon suivante : on solubilise les polymères dans une solution aqueuse à pH 7 (tampon phosphate) et on ajoute 5 mg du colorant dénommé Orange OT (Rn CAS : 2646-17-5). On laisse les solutions dans un bain d'ultrason pendant une heure pour réaliser l'association. Les solutions sont ensuite centrifugées pour éliminer le colorant non-associé et on mesure la densité optique au λ_{\max} du colorant qui se situe à 495 nm.

25

Tableau 3 :

Polymère	Taux de greffage	Concentration polymère	DO normalisée
P1 (alpha-tocophérol)	7,8 % molaire	13,8 mg/mL	1
Polymère comparatif* (dodécanol)	15 % molaire	17,3 mg/mL	0,45

*WO 00 30618

- On constate qu'à un taux de greffage molaire inférieur de moitié et à une concentration massique en polymère un peu plus faible, le polymère P1 présente une capacité d'association du colorant Orange OT bien supérieure.

30

Exemple 9 : synthèse du polymère P7***Synthèse d'un polyglutamate ayant un greffon d'alpha-tocophérol leucine.***

On synthétise d'abord le dérivé alpha-tocophérol leucine de la façon suivante.

On fait réagir le D,L-alpha-tocophérol (4,3 g) avec la BOC-Leucine (2,3 g) dans 15 mL de
5 dichlorométhane en présence de 4-diméthylaminopyridine (244 mg) et de
diisopropylcarbodiimide (1,5 g). Après 2 heures à 30°C, le produit est purifié par filtration
sur une colonne de silice. On obtient 5 g du produit alpha-tocophérol leucine BOC
(rendement 77 %). Sa structure est confirmée par spectroscopie RMN. La déprotection du
10 produit est réalisée dans l'acide trifluoroacétique à une température comprise entre 5 et
10°C pendant une heure. Après purification par filtration sur silice, on isole 3,3 g du
produit souhaité (rendement 78%). Sa structure est confirmée par spectroscopie RMN.

On réalise ensuite la réaction de greffage sur un acide polyglutamique dans les mêmes
conditions que dans l'exemple 1, avec un taux de greffage de 7 %. La structure du
polymère et le taux de greffage ont été confirmés par spectroscopie RMN.

15

Exemple 10 : Adsorption de l'insuline

On prépare une solution à 1 mg du polymère P1 et 7 mg d'insuline à pH 7,0 dans 1 ml
d'eau et on laisse incuber pendant 2 heures. La suspension est ensuite ultrafiltrée (10000G,
20 minutes avec un seuil de 100 KDa). On dose l'insuline libre dans le filtrat par HPLC et
20 on en déduit par différence la quantité d'insuline associée. On mesure un taux d'association
qui est supérieur à 95 % par rapport à l'insuline engagée. Dans les mêmes conditions, le
polymère comparatif de l'exemple 8 permet d'associer 40 %. La capacité d'adsorption du
polymère P1 est donc supérieur.

25 Exemple 11 : Dégradation *in-vitro* du polymère P1 en présence d'enzymes

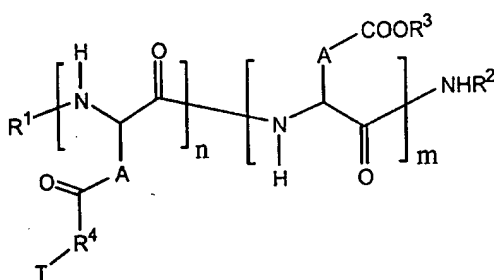
On solubilise le polymère P1 à pH 7,5 (tampon phosphate et 10 mM en cation calcium) et
à une concentration de 20mg/mL. On ajoute 0,1 mL de protéase (solution de 10mg/mL) et
on suit la dégradation par la GPC aqueuse.

On constate une dégradation relativement rapide avec un temps de demi-vie du polymère
30 initiale à environ 100 minutes.

REVENDECATIONS

1. Polyaminoacides comprenant des unités aspartiques et/ou des unités glutamiques, caractérisés en ce qu'au moins une partie de ces unités sont porteuses de greffons comportant au moins un motif alpha-tocophérol.

2. Polyaminoacides selon la revendication 1, caractérisés par la formule générale (I) suivante :



(I)

dans laquelle :

- R^1 représente un H, un alkyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10, benzyle, une unité acide aminé terminale ;
- R^2 représente un H, un groupe acyle linéaire en C2 à C10 ou ramifié en C3 à C10 ou un pyroglutamate ;
- R^3 est un H ou une entité cationique, de préférence sélectionnée dans le groupe comprenant :
 - les cations métalliques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant : le sodium, le potassium le calcium, le magnésium,
 - les cations organiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant :
 - les cations à base d'amine,
 - les cations à base d'oligoamine,
 - les cations à base de polyamine (la polyéthylèneimine étant particulièrement préférée),
 - les cations à base d'acide(s) aminé(s) avantageusement choisis dans la classe comprenant les cations à base de lysine ou d'arginine,
 - ou les polyaminoacides cationiques avantageusement choisis dans le sous-groupe comprenant la polylysine ou l'oligolysine ;

- R^4 représente une liaison directe ou un "espaceur" à base de 1 à 4 unités acide aminé ;
- A représente indépendamment un radical $-CH_2-$ (unité aspartique) ou $-CH_2-CH_2-$ (unité glutamique) ;
- 5 ▪ $n/(n+m)$ est défini comme le taux de greffage molaire et varie de 0,5 à 100 % molaire ;
- $n + m$ varie de 3 à 1000, de préférence entre 30 et 300 ;
- T représente un motif alpha-tocophérol.

10 3. Polyaminoacides selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que l'alpha-tocophérol est d'origine naturelle.

15 4. Polyaminoacides selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce que l'alpha-tocophérol est d'origine synthétique.

15 5. Polyaminoacides selon la revendication 2, caractérisés en ce qu'il est constitué d'un homopolymère d'alpha-L-glutamate ou d'alpha-L-glutamique.

20 6. Polyaminoacides selon la revendication 2, caractérisés en ce qu'il est constitué d'un homopolymère d'alpha-L-aspartate ou d'alpha-L-aspartique.

25 7. Polyaminoacides selon la revendication 2, caractérisés en ce qu'il est constitué d'un copolymère d'alpha-L-aspartate/alpha-L-glutamate ou d'alpha-L-aspartique/alpha-L-glutamique.

30 8. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisés en ce que la distribution des unités aspartiques et/ou glutamiques porteuses de greffons comportant au moins un motif alpha-tocophérol est telle que les polymères ainsi constitués sont soit aléatoires, soit de type bloc, soit de type multibloc.

30 9. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisés en ce que leur masse molaire se situe entre 2 000 et 100 000 g/mole, et de préférence entre 5 000 et 40 000 g/mole.

35 10. Polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisés en ce que le taux de greffage molaire se situe entre 3 et 70 %, et de préférence entre 5 et 50 %.

11. Composition pharmaceutique, cosmétique, diététique ou phytosanitaire comprenant au moins l'un des polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

5 12. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un principe actif.

10 13. Composition selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce que le principe actif est une protéine, une glycoprotéine, un polysaccharide, un liposaccharide, un oligonucléotide, un polynucléotide ou un peptide.

14. Composition selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce que le principe actif est une petite molécule organique hydrophobe, hydrophile ou amphiphile.

15 15. Composition selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisée en ce qu'elle peut être administrée par voie orale, parentérale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intra péritonéale, intracérébrale ou buccale.

20 16. Composition selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisée en ce qu'elle est sous forme d'un gel, d'une émulsion, de micelles, de nanoparticules, de microparticules, d'une poudre ou d'un film.

25 17. Composition selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, caractérisée en ce qu'elle est une suspension colloïdale de nanoparticules et/ou de microparticules et/ou de micelles de polyaminoacides, dans une phase aqueuse.

30 18. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisée en ce qu'elle est sous forme de solution dans un solvant biocompatible et en ce qu'elle peut être injectée en sous-cutané, intramusculaire ou dans une tumeur.

19. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisée en ce qu'elle est apte à former un dépôt sur le site d'injection.

35 20. Procédé de préparation :

- de médicaments, en particulier pour administration orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale ou intracérébrale, les principes actifs de ces médicaments

pouvant être, notamment, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des liposaccharides, des oligonucléotides, des polynucléotides et des petites molécules organiques hydrophobes, hydrophiles ou amphiphiles,

5

- et/ou des nutriments,
- et/ou de produits cosmétiques ou phytosanitaires;

caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement à mettre en œuvre au moins l'un des polyaminoacides selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 et/ou la composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.

10



2840614

N° d'enregistrement
national

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 621199
FR 0207008

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	EP 0 179 023 A (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 23 avril 1986 (1986-04-23) * le document en entier *		C08G69/48 A61K47/42 A61K31/785 A61K9/51
D,A	& US 4 888 398 A (BICHON ET AL) 19 décembre 1989 (1989-12-19)		
A	WO 87 03891 A (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE) 2 juillet 1987 (1987-07-02) * revendications *		
A	US 6 320 017 B1 (ANSELL STEVEN MICHIAL) 20 novembre 2001 (2001-11-20) * revendications *		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
			C08G A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 mai 2003		Leroy, A	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

2

2840614

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0207008 FA 621199**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 07-05-2003.
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0179023	A	23-04-1986	AT 60340 T	15-02-1991
			CA 1336034 A1	20-06-1995
			DE 3581471 D1	28-02-1991
			EP 0179023 A2	23-04-1986
			JP 1963038 C	25-08-1995
			JP 6089138 B	09-11-1994
			JP 61101533 A	20-05-1986
			US 4976962 A	11-12-1990
			US 4888398 A	19-12-1989
WO 8703891	A	02-07-1987	CH 667874 A5	15-11-1988
			WO 8703891 A1	02-07-1987
			EP 0250492 A1	07-01-1988
			JP 63502037 T	11-08-1988
			US 4892733 A	09-01-1990
US 6320017	B1	20-11-2001	US 2002026027 A1	28-02-2002
			AU 751434 B2	15-08-2002
			AU 1746099 A	19-07-1999
			CA 2315695 A1	08-07-1999
			WO 9933493 A1	08-07-1999
			EP 1041976 A1	11-10-2000
			JP 2001527052 T	25-12-2001

EPO FORM P0485